



*Compte-rendu du colloque*

**Stabilité et formulation des protéines et  
des peptides : enjeux et perspectives**

23 & 24 Septembre 2015

Biocitech, Romainville

## **Table des matières**

Session 1 : Enjeux et problématiques, du procédé au marché .....	5
Session 2 : Outils d'études pour la stabilité des protéines et peptides .....	7
Session 3 : Suivi de stabilité des protéines et peptides par méthodes biophysiques et biologiques .....	11
Session 4 : Nouvelles technologies de formulation.....	15
Session 5 : Table ronde – Prédiction de stabilité approche plateforme, perspectives.....	18
Conclusion.....	21
Liste des abréviations .....	22

## **Tables des figures et des tableaux**

Figure 1 : Répartition en fonction du type d'organisation.....	3
Figure 2 : Répartition en fonction des domaines d'application .....	4
Tableau 1 : Axes possibles permettant d'étudier les interactions des protéines .....	6
Tableau 2: Objectifs des études à mener.....	7
Tableau 3 : Avantages et inconvénients des techniques permettant d'étudier la stabilité des protéines et des peptides.....	8
Tableau 4 : Informations obtenues par les méthodes de DSC et d'ITC.....	13
Tableau 5 : Points de convergence et de divergence existant entre le monde de l'alimentaire et le monde de la santé/pharmaceutique .....	20

# Colloque : Stabilité et formulation des protéines et des peptides : Enjeux et perspectives

23 & 24 septembre 2015

Biocitech, Romainville

Ce colloque a été organisé par Adebitech, Think Tank des biotechnologies, et a été marqué par une forte participation d'industriels (62%) mais également d'académiques (27%) et d'institutionnels (9%) (Figure 1) issus des domaines de l'agroalimentaire et de la santé/pharmaceutique (Figure 2). Une des caractéristiques a été la présence d'équipementiers et de développeurs d'outils analytiques pour les protéines et les peptides.

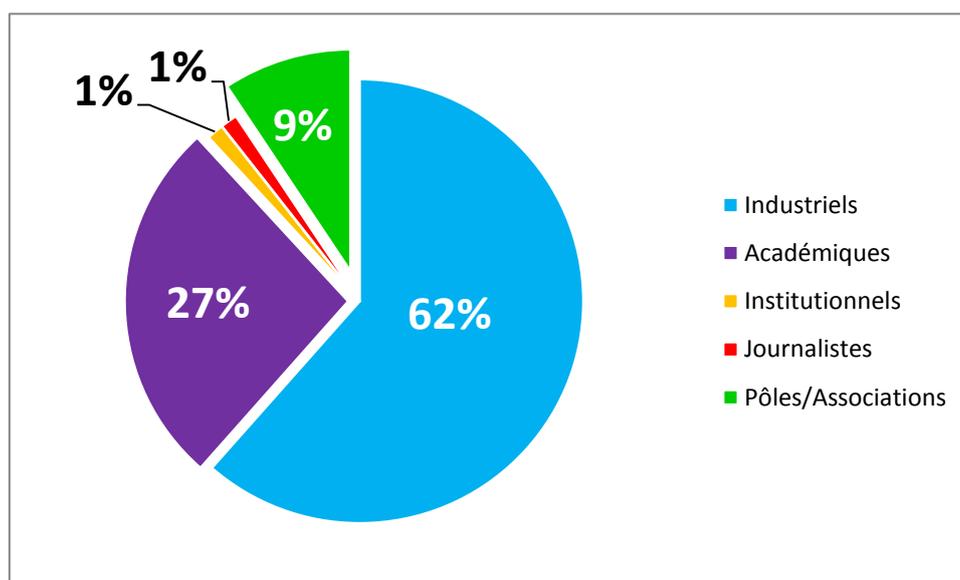


Figure 1 : Répartition en fonction du type d'organisation

Les objectifs principaux de ce colloque étaient d'établir des relations entre les deux mondes de la santé/pharmaceutique et de l'agroalimentaire afin d'aboutir à des partages de connaissances et de technologies pouvant mener à la mise en place de collaborations. En effet, tous les acteurs ont pu profiter de ces deux journées pour échanger, partager leurs opinions et proposer des solutions répondant aux nouveaux enjeux.

Ce colloque a été articulé autour de cinq sessions dont une table ronde :

- Session 1: Enjeux et problématiques du procédé au marché
- Session 2: Outils d'études pour la stabilité des protéines et peptides
- Session 3: Suivi de stabilité des protéines et peptides par méthodes biophysiques et biologiques
- Session 4: Nouvelles technologies de formulation
- Session 5: Table ronde – Prédiction de stabilité approche plateforme, perspectives

L'ensemble des discussions a été animé par 23 interventions, 17 posters dont 10 ont été présentés à l'oral lors d'une session « Flash posters ». La présence de 8 exposants a permis de mettre en avant les innovations dans les études de stabilité et de formulation des protéines et des peptides quelle que soit l'application (Figure 2) et a appuyé la volonté des développeurs d'analyses performantes de partager leur savoir-faire et leurs connaissances. On peut dire que 65% des participants étaient liés au domaine de la santé (Figure 2). Vingt-sept pour cent étaient issus de l'agroalimentaire et 8% représentaient les deux secteurs. L'objectif étant que ces 8% s'élargissent.

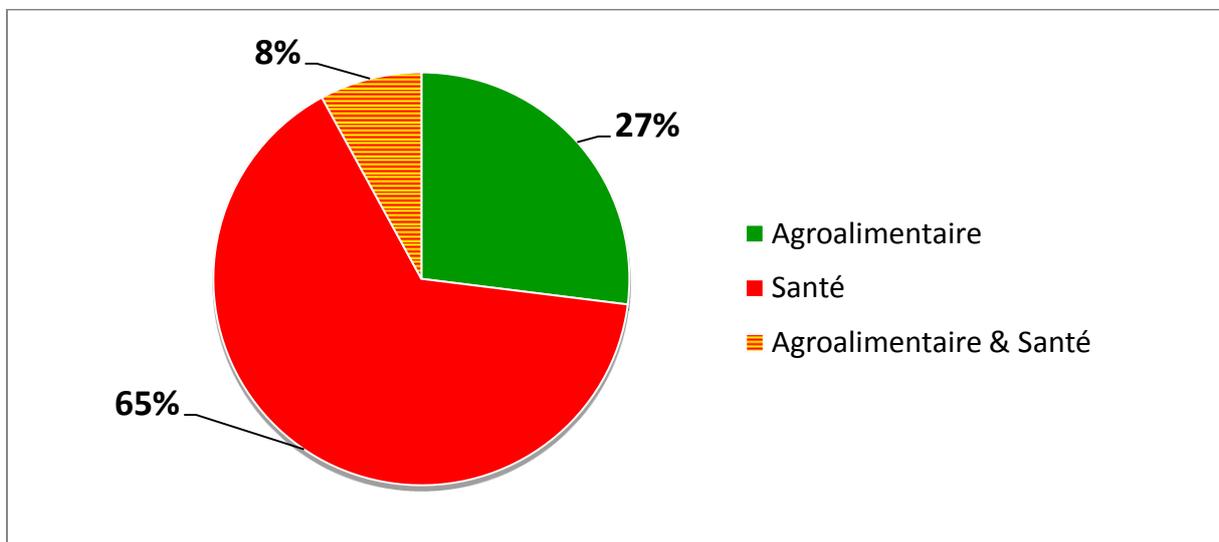


Figure 2 : Répartition en fonction des domaines d'application

## Session 1 : Enjeux et problématiques, du procédé au marché

Cette session regroupant des intervenants du monde santé/pharmaceutique et agroalimentaire a permis d'établir un état des lieux sur le sujet des protéines et des peptides. Quels sont les enjeux, les applications, les contraintes mais également les problématiques qui se posent à ce sujet ?

Tous les participants se sont accordés sur le fait que l'enjeu principal réside dans **la stabilité**, c'est-à-dire la capacité d'une protéine à maintenir une conformation structurale lorsqu'elle est extraite, purifiée et formulée. C'est l'un des points clé pour comprendre et appréhender l'utilisation de ces protéines et de ces peptides.

Cette thématique a donc été traitée selon différents angles : la stabilité des protéines et des peptides en solution pour la thérapeutique, la stabilité au niveau de leur utilisation dans les centres hospitaliers mais aussi l'application alimentaire avec les problèmes de formulation d'ingrédients.

Ainsi, pour déterminer la stabilité des protéines et des peptides, il faut pouvoir contrôler les agrégations, pouvoir les anticiper en étudiant, entre autre, les stades précoces de développement. Pour se faire, les méthodes physiques comme par exemple, le dichroïsme circulaire (CD), la calorimétrie différentielle à balayage (DSC) ou l'absorption en UV représentent des outils puissants pour détecter et quantifier des modifications comme celles que l'on peut repérer au niveau des HOS (Higher Order Structure) (**Joël RICHARD** : IPSEN).

Plusieurs méthodes sont nécessaires pour mener à une bonne connaissance de la stabilité des protéines thérapeutiques étudiées (**Jacques DUMAS** : Sanofi). Cette stabilité doit être contrôlée à toutes les étapes de formulation jusqu'au lit du malade.

Une conférence intéressante a été présentée concernant les études de stabilité des protéines et des peptides en milieu hospitalier (**Alain ASTIER** : Hôpital Henri Mondor). Ces études miment le plus fidèlement possible les conditions d'utilisation afin que les données de stabilité correspondent à la réalité. De manière générale, il est important de noter que les protéines médicaments utilisées en milieu hospitalier sont plus stables que ce qu'indiquent les

fournisseurs. Le personnel hospitalier peut alors les utiliser sur du plus long terme en prenant soin de respecter certaines consignes de stockage : température, tampon, temps etc.

Une proposition a été soulevée concernant le concept de *dose-banding* qui consiste en la préparation d'un nombre standardisé de doses pour un traitement donné et non la fabrication de grandes quantités pouvant être perdues si elles ne sont pas utilisées.

Au cours de la discussion, il est apparu nécessaire de favoriser les dialogues entre les industriels et les utilisateurs afin que leurs attentes soient au mieux cernées.

Au niveau de l'agroalimentaire, les études menées s'intéressent aux interactions inter et intramoléculaires. Ces études permettent d'une part de limiter les effets négatifs dus aux interactions mais également de générer de nouvelles fonctionnalités (ou d'améliorer des fonctionnalités déjà existantes) (**Denis CHÉREAU : IMPROVE**).

Afin de maîtriser ces interactions, plusieurs axes d'études sont possibles :

**Tableau 1 : Axes possibles permettant d'étudier les interactions des protéines**

<b>Molécule native</b>	Poids moléculaire
	Flexibilité
	Acides aminés
	Charges
	Ponts disulfures
	Point isoélectrique
	Formation d'agrégats *
<b>Paramètres procédés</b>	Mode de variation de température et de pression
	Cisaillement
<b>Paramètres environnementaux</b>	pH
	Force ionique
	Type d'ions
	Concentration
	Température

\*La principale cause d'agrégations est due à des stress mécaniques comme les secousses, les agitations, le cisaillement, les expositions à des interfaces hydrophobes etc. ce qui rend parfois les analyses plus complexes.

Enfin, les études à mener sont de :

**Tableau 2: Objectifs des études à mener**

Maîtriser les conditions de formation de complexes
Etablir des diagrammes d'état
Déterminer la structure des assemblages
Explorer les propriétés
Etablir les relations structures/fonctionnalités

En conclusion de cette session, tous les intervenants s'accordent sur le fait que la stabilité des protéines et des peptides est fondamentale. Or, de nombreux outils existent déjà ou bien sont actuellement mis en place permettant une amélioration de cette stabilité.

## **Session 2 : Outils d'études pour la stabilité des protéines et peptides**

Cette session a permis de faire le point des méthodes physico-chimiques et biologiques permettant de prévoir la stabilité des protéines et des peptides. Afin d'appréhender cette stabilité, il faut tout d'abord comprendre les aspects structuraux mais également réaliser des études sur la concordance entre la biologie et la physique.

Tableau 3 : Avantages et inconvénients des techniques permettant d'étudier la stabilité des protéines et des peptides

Techniques	Avantages	Inconvénients	Domaine d'application	Transfert possible ?	Freins
Méthodes de diffusion par rayonnement <b>(Christophe TRIBET :</b> Ecole nationale supérieure, Paris)	Détection sensible des agrégats très importante Forte sensibilité aux particules de poids moléculaires élevé Utilisation de petites quantités (2-20 ml, 0,1-100g / L) Non invasive Rapide (<10s- 2 min; rapides SAXS = ms) Large gamme de taille (<nm - microns) Mesure de la viscosité (DLS)	Quantification difficile Signal dépendant de la morphologie des particules et de l'indice de réfraction Filtration nécessaire pour la diffusion de lumière Estimations du pourcentage d'agrégats Confusion des protéines avec des poussières, des bulles etc.	Santé: sur des émulsions (type gouttelettes protéique) Composition globale des protéines Interactions protéines/protéines	Oui	Que peut-on réellement quantifier? Quelles sont les bonnes conditions de mesure? Question en suspens quant aux interfaces
Corrélation de fluorescence <b>(Christophe TRIBET)</b>	Obtention d'un nombre d'objets fluorescents dans un volume donné --> nombre d'agrégations de protéines dans un milieu complexe	Marquage des protéines nécessaire Mesures réalisées sur des ensembles donc résultats moyennés par l'ensemble de la population étudiée	Santé/Pharmaceutique	Oui	Conditions varient selon la taille de l'échantillon : Petit --> intensité varie avec le temps de concentration Gros --> intensité varie en fonction de la concentration des agrégats
Cristallographie <b>(Claudine MAYER :</b> Université Paris Diderot, Institut Pasteur)	Permet de détecter la matière et mène à la modélisation de molécules biologiques	Ce n'est pas sûr que les modifications <i>in vitro</i> correspondent vraiment aux conditions <i>in vivo</i>	Santé/Pharmaceutique	Oui	Dus à l'instrumentation Utilisation de tampons d'intérêt spécifique
Calorimétrie différentielle <b>(Romain KAPEL :</b> Université de Lorraine ; <b>Marie-Hélène ROPERS :</b> INRA)	Permet de séparer des résultats d'analyses qui se superposeraient Bonne sensibilité Bonne résolution	Gamme de températures parfois limitée Variations de la forme des thermogrammes peuvent être importantes	Alimentaire	Oui	Méthode dépendant de plusieurs paramètres (masse de l'échantillon, vitesse de chauffage etc.)

Il existe de nombreuses techniques telles que les méthodes de diffusion par rayonnement, les méthodes de calorimétrie ou encore de cristallographie. **Elles sont, pour certaines, spécifiques à un domaine mais peuvent être transférables d'un univers à l'autre.**

D'autres méthodes ont été évoquées sans être discutées de manière approfondie :

- La DLS (Dynamic Light Scattering)
- La spectroscopie de Raman
- L'ITC (Isothermal Titration Calorimetry)
- La microcalorimétrie
- La TSA (Thermal Shift Assay)
- La SPR (Surface Plasmon Resonance)
- La DSC (Differential Scanning Calorimetry)
- La RMN (Résonance Magnétique Nucléaire)
- La microscopie à force atomique
- La microscopie électronique à transmission
- La cryomicroscopie

Ces techniques s'appliquent aux protéines et peptides quelles que soient les applications.

Une association protéine laitière/protéine végétale a été présentée (**Jean-Jacques SNAPPE** : Ingredia). Il s'agit du couplage d'isolats de protéines de lait et de protéines de pois. Cette combinaison présente plusieurs paramètres avantageux :

- Elle ne sédimente pas quel que soit le pH
- Elle a les mêmes propriétés de coagulation que les protéines laitières

Les protéines en agroalimentaire, d'origine végétale ou animale présentent ainsi un enjeu mondial quantitatif mais aussi fonctionnel et qualitatif. A long terme, l'association de protéines laitières & végétales présentera un réel avantage pour palier à la pénurie des protéines laitières vers laquelle on se dirige.

La digestion est un modèle d'étude qui permet d'élucider de nombreux points clés dans la stabilité. Il s'agit d'un processus naturel qui a pour but d'obtenir des acides aminés libres mais également un mélange de peptides assimilables par l'organisme. Ces peptides bioactifs présentent une stabilité *in vitro*. Ainsi l'étude du peptidome permet de comprendre comment les séquences, les conformations, les conditions environnementales et les protéases peuvent

influer sur la stabilité des peptides. L'étude de ces peptides peut présenter un intérêt pour la santé (**Benoît CUDENNEC & Christophe FLAHAUT** : Institut Charles Viollette).

Ce colloque a montré la diversité des protéines et des peptides pour des applications thérapeutiques & vaccinales (anticorps monoclonaux, anticorps monoclonaux ciblés) nutritionnelles et de diagnostic. La conférence de **Dario NERI** (Ecole Polytechnique de Zurich) : *Armed antibodies and targeted for cancer therapy: from the bench to the clinic* est un bon exemple d'application d'anticorps monoclonaux ciblés pour la cancérologie et les maladies auto-immunes.

Ainsi, l'une des techniques établie a été de fusionner des facteurs anti-cancéreux (TNF : Tumor Necrosis Factor) à des anticorps (exemple du L19) afin de mieux cibler les tumeurs. Cette étude a été réalisée sur des sarcomes puisque ce type de tumeurs est extrêmement sensible au TNF.

D'autres associations ont été réalisées entre l'interleukine (IL2) et des anticorps comme le L19 ou le F16 afin de pouvoir moduler l'immunité.

Ces études ont démontré que les traitements utilisés pouvaient être également efficaces sur les leucémies. Les résultats obtenus commencent à être pertinents au bout d'une quinzaine de jours.

L'entreprise Philogen (société de biotechnologies suisse-italienne co-fondée par **Dario NERI**) a également développé des stratégies de ciblage vasculaire au-delà de l'oncologie : endométriose, arthrose, sclérose en plaques, vasculopathie, angiogenèse oculaire etc.

Les vaisseaux sanguins des tumeurs expriment des marqueurs tels que les isoformes de fibronectine ou de la ténascine-C, marqueurs qui ne se retrouvent pas sur les vaisseaux sains. Les vaisseaux sanguins tumoraux représentent alors des cibles sélectives pour les traitements utilisant des dérivés d'anticorps monoclonaux donnant des résultats thérapeutiques très prometteurs.

### Session 3 : Suivi de stabilité des protéines et peptides par méthodes biophysiques et biologiques

L'agrégation est une cause principale de l'immunogénicité des peptides et protéines. L'étude en amont de la stabilité est essentielle afin que la formulation soit optimale.

De nombreux outils et stratégies ont vu le jour pour obtenir des informations précises (le poids moléculaire, la stabilité conformationnelle, la solubilité ou encore la viscosité relative) et ainsi anticiper la stabilité protéique (**Samir SAFI** : Malvern).

Un frein important pour les protéines thérapeutiques, est l'échantillonnage (concentration basse pour de très faibles volumes).

Parmi les méthodes pour un suivi de la stabilité, la combinaison de deux techniques telles que la méthode DLS et la spectroscopie de Raman permet d'obtenir des informations comme le poids moléculaire, la structure secondaire, les interactions, la stabilité colloïdale ou bien encore conformationnelle.

Ce couplage de méthodes donne également des renseignements quant aux changements structuraux : variations des ponts disulfures lorsqu'on augmente la température du milieu.

D'autres facteurs comme l'huile de silicone, le caoutchouc, le téflon, le verre ou bien encore la cellulose peuvent augmenter les phénomènes d'agrégaions qui seront à prendre en compte dans les procédés de formulation.

Des stratégies ont également pu être mises en place comme la cyclisation des chaînes latérales des peptides (Prénylation et PEGylation entre autre) (**Maud LARREGOLA** : Platform PeptLab).

Cette cyclisation rend la molécule plus rigide et donc moins réactive aux enzymes protéolytiques. Cela permet une augmentation de sa stabilité métabolique *in vitro* et plus significativement *in vivo*.

Pour augmenter la stabilité d'une molécule, il est mentionné la possibilité de faire varier la longueur de la chaîne d'acides aminés mais aussi la nature de ces acides aminés. Ces méthodes de modifications de structure (sur les hélices  $\alpha$  et les feuillets  $\beta$ ) peuvent mener à l'élaboration d'un modèle stable. Les techniques de comparabilité permettent donc d'éliminer

les modèles non pertinents. Il est également important de mesurer les activités biologiques de ces molécules afin de connaître leur intérêt potentiel.

Dans le cas des anticorps monoclonaux thérapeutiques, une approche analytique a permis d'identifier la stabilité. Par induction d'un stress oxydatif, l'identification de modifications post-traductionnelles (N-glycosylation, déamidation, oxydation) a été avancée et a permis l'établissement d'une cartographie peptidique (**Géry VAN VYNCHT** : Quality assistance).

D'autres techniques mettant en jeu la microcalorimétrie peuvent aider à optimiser la formulation de protéines thérapeutiques (**Michel DESMADRIL** : Institut de biologie intégrative de la cellule).

Le TSA permet de travailler sur de petits volumes (~3µL) et de très faibles quantités (<200ng/puits) sachant que chaque puits correspond à une condition. Cela donne la possibilité de tester jusqu'à 384 conditions différentes en une seule analyse durant entre 60 et 90 minutes.

L'ITC constitue une méthode mesurant la chaleur échangée lors d'une réaction entre une molécule A et une molécule B. Il est alors possible d'en tirer des informations telles que l'enthalpie :  $\Delta H$ , l'entropie :  $\Delta S$ , l'énergie libre :  $\Delta G$ , etc.

Cette technique se veut alors complémentaire de la méthode DSC qui permet la mesure d'un échange d'énergie durant un processus mais aussi de la SPR qui mesure les interactions.

Le développement de la formulation de protéines intègre deux techniques principales, la calorimétrie différentielle à balayage (DSC) et la calorimétrie de titration isotherme (ITC). L'ITC permet la caractérisation thermodynamique des processus de liaison, y compris protéine-protéine et les liaisons protéine-ligand, tandis que la DSC permet de caractériser la stabilité thermodynamique de la protéine. Aujourd'hui, les deux techniques sont essentielles en laboratoires de formulation et l'utilisation de la DSC a pour but principal de prédire la stabilité.

Elles peuvent aussi être utilisées pour des études sur le repliement des protéines, les activités enzymatiques ou bien sur des interactions d'origine non biologiques. Ainsi, ces différentes méthodes calorimétriques représentent des technologies incontournables pour optimiser la formulation des protéines thérapeutiques :

Tableau 4 : Informations obtenues par les méthodes de DSC et d'ITC

DSC	ITC
Évaluation de la stabilité des protéines	Informations sur l'affinité et la sélectivité des ligands
Sélection des meilleures conditions de stockage	Utilisation lors d'activité enzymatique de contrôle
Aide lors de la recherche de molécules candidats	

D'autres méthodes ont été évoquées comme :

- La résonance magnétique nucléaire : RMN
- La cristallographie aux rayons X
- La microscopie à force atomique
- La microscopie électronique à transmission

La RMN est une technique de choix pour travailler sur des petites protéines et des peptides. Elle permet l'obtention d'informations sur l'organisation structurale qui mène à la caractérisation des échantillons. L'objectif final étant d'atteindre une structure tridimensionnelle de la protéine qu'elle soit seule ou associée à des ligands. Cependant, il est parfois difficile d'obtenir des cristaux 3D qui diffractent à haute résolution. Dès que la taille de l'objet d'étude devient trop importante, il est possible de basculer sur la cristallographie à rayons X.

La microscopie à force atomique est une technique de balayage permettant l'obtention de caractéristiques sur la morphologie et la mesure d'interactions de force. Cette méthode est principalement utilisée pour tous les phénomènes se produisant au voisinage des membranes.

Quant à la microscopie électronique à transmission elle entraîne une caractérisation fine de l'échantillon biologique. Il est possible de traiter les images obtenues afin de remonter jusqu'à la structure atomique des objets. La cryomicroscopie peut également être utilisée pour observer des échantillons congelés.

La partie d'analyses biologiques a été moins développée que la partie physico-chimique mais elle présente néanmoins un grand intérêt.

La mesure de l'activité anticomplémentaire (ACC) des immunoglobulines (Ig) intraveineuses a également été décrite (**Gérald PERRET** : LFB Biotechnologies). Il s'agit d'une méthode biologique permettant le suivi de stabilité. Elle mène à l'identification d'activateurs inopinés du complément comme peuvent l'être les agrégats ou les immunoglobulines de type M.

Cependant, ce protocole de l'ACC est largement critiqué car uniquement obligatoire au sein de l'union européenne. D'autre part, il peut représenter un frein à de nouvelles découvertes thérapeutiques. Il s'agit d'un test particulièrement complexe et pouvant être interprétable.

La problématique évoquée repose donc sur la mise en place d'un ou plusieurs autre(s) test(s) pouvant palier à l'efficacité douteuse de la mesure de l'ACC selon la Pharmacopée Européenne.

Actuellement, deux méthodes alternatives pourraient être mise en place. Tout d'abord un test ELISA Cq1 dont le principe repose sur la capacité de liaison entre IgG (dénaturées, agrégées ou engagées dans un complexe immun) et Cq1 immobilisé sur une plaque.

D'autre part, la libération du C5a qui permet de mesurer l'activation du complément par la préparation d'IgG à tester dans du sérum humain.

Puisque la notion de sensibilité est priorisée, il est important de noter que la méthode C5a apparaît comme la plus sensible pour mimer une augmentation de l'activité AAC. De plus, elle présente une belle corrélation avec la méthode de référence de la pharmacopée européenne.

Ainsi, cette nouvelle approche de l'AAC se révèle être pertinente et fonctionnelle et permet de limiter les biais. Finalement, cette mesure de l'AAC s'avère être utile puisqu'elle possède une sensibilité plus importante que celle des méthodes physicochimiques classiques et elle mène à l'obtention d'informations telles que :

- La présence de polymères particuliers activateurs du complément
- La présence d'activateurs du complément (ADN ou sucres bactériens par exemple)

Des études réalisées au niveau structural permettent ainsi d'étoffer le panel de techniques existantes pour prédire ou améliorer la stabilité des protéines. Cela passe également par une augmentation de la durée de vie des peptides et l'établissement de modèles stables. Les différents niveaux d'analyse entraînent ainsi la mise en place de divers degrés de précision.

## Session 4 : Nouvelles technologies de formulation

La stabilité des protéines et peptides est un enjeu crucial dans l'élaboration de produits/ingrédients ou dans la formulation de nouvelles protéines thérapeutiques. La formulation en tant que telle est tout aussi complexe puisqu'elle fait intervenir de nouvelles techniques. Les stratégies de délivrance de molécules médicamenteuses, le séchage des protéines par pulvérisation, l'amélioration de leur biodiversité ou encore leur encapsulation ont été abordés au cours de cette session.

De nouvelles manières de délivrer des molécules thérapeutiques ont été présentées (**Gilles PONCHEL** : Institut Galien CNRS). L'objectif était de dresser un panorama général de plusieurs travaux réalisés depuis des années dans la formulation afin d'améliorer la délivrance de protéines sans passer par les voies parentérales. La principale différence observée sur le passage de molécules à travers les barrières épithéliales est due au poids moléculaire de ces particules. Cependant, le temps de demi-vie a un rôle également important : temps assez court pour les peptides et plus long pour les protéines plus grosses telles que les anticorps monoclonaux. Ce temps de demi-vie dépend entre autres des concentrations plasmatiques.

Ainsi, plusieurs voies de délivrance ont été étudiées à commencer par la voie nasale qui représente un grand nombre d'études pour les peptides. Elle permet l'absorption rapide des molécules et une clearance muco-ciliaire est observée au niveau des muqueuses. Cette clearance est induite par la présence d'un épithélium cilié sur lequel est posée une couche de mucus. Du fait de leur poids moléculaire important, les grosses molécules sont moins bien absorbées. Cependant, une formulation mucoadhésive permet un contact plus long avec la muqueuse nasale et ainsi une meilleure absorption.

La voie orale a également été abordée puisqu'il s'agit d'une voie intéressante pour les protéines et les peptides. Elle présente néanmoins une utilisation complexe car les environnements de l'estomac au colon sont très variables les uns par rapport aux autres. Cela rend la prédiction des formulations adaptées à chaque environnement plus difficile. L'utilisation de nanoparticules pourrait représenter une alternative intéressante permettant d'avoir des systèmes de très petite taille contenant de nombreuses fonctionnalités. De plus, on peut les rendre mucoadhésives, leur faire ouvrir des jonctions serrées etc.

De manière générale, une meilleure compréhension des barrières épithéliales permet un affinement des connaissances.

Une autre alternative de stabilisation des protéines et des peptides repose sur des séchages spécifiques et la mise sous forme de poudres (**Jean-Eudes VENDEVILLE** : Innov'IA). Les techniques de séchage sont à l'heure actuelle des méthodes maîtrisées pouvant être de différents types : séchage par atomisation, micro-encapsulation, granulation ou encore enrobage. La mise en forme de poudres permet une transformation d'ingrédients tout en conservant leurs caractéristiques et en leur attribuant de nouvelles fonctions mais également une protection des principes actifs.

Afin de protéger les protéines et les peptides, il existe deux techniques différentes :

- La microencapsulation c'est-à-dire l'incorporation du principe actif dans la matrice avant séchage  
→ Technique d'atomisation
- L'encapsulation qui repose sur le coating de l'actif déjà sous forme solide  
→ Technique d'enrobage

La difficulté rencontrée est de pouvoir libérer l'actif tout en le protégeant. Pour cela, il est important d'identifier les facteurs permettant sa libération.

Le couplage des techniques de séchage et de formulation permettent ainsi la fonctionnalisation des protéines et des peptides. Ces méthodes sont principalement utilisées en agroalimentaire car elles sont appliquées sur des quantités importantes d'actifs (500g de poudre lors d'un enrobage de particules) et non pour la thérapeutique.

Afin de maintenir des protéines stables, il est possible d'améliorer leurs biodisponibilités (**Jean-Pascal ZAMBAUX** : Hydro-Fill).

Le but principal est de pouvoir protéger l'agent actif sans bloquer ses sites actifs. Pour se faire, l'auteur cherche à fixer de manière non covalente un conjugué sur l'agent actif. Cette façon de faire est simple et rapide mais nécessite cependant une étape finale afin d'éliminer l'excès de conjugués. De nombreuses études de toxicité ont été réalisées sur ces adjuvants.

Afin de conserver une protéine jusqu'à son utilisation, il est possible de la lyophiliser. Cependant, cette méthode présente plusieurs inconvénients parmi lesquels on trouve :

- La perte du principe actif
- Le coût
- La limite dans la taille des lots

La lyophilisation en présence de poly-lysine pourrait donc rendre stable une protéine facilitant ainsi sa voie d'administration chez un patient. L'amélioration de la biodisponibilité des principes actifs permet ainsi la réduction des quantités utilisées et mène également à une réduction des coûts de fabrication des lots.

Une autre technique repose sur l'encapsulation par pressurisation de CO<sub>2</sub> (**Frank BOURRY : INSERM**).

Des protéines peuvent être encapsulées selon plusieurs méthodes :

- Dans des microsphères de PLGA (Poly(Lactic-co-Glycolic Acid))
- Dans des microparticules de carbonate de calcium

Afin d'encapsuler des protéines, une nano-précipitation est d'abord effectuée permettant d'obtenir une protéine solide plus stable qu'à l'état moléculaire. Cependant, le mécanisme de formation de ces particules reste complexe puisqu'il est pH et pression-dépendant. Cela amène néanmoins à la possibilité de maintenir une protéine stable pendant 2 à 3 ans. La viabilité cellulaire étant ainsi maintenue, ce procédé permet de garder les cellules utilisées pour des applications diverses.

Différentes perspectives ont donc été évoquées :

- Obtention de protéines encapsulées dans des microparticules sans solvant toxique ni tensioactif
- En ingénierie tissulaire, des cellules souches encapsulant des protéines dans un biomatériau pourraient permettre la recalcification de tissus

Cependant, des améliorations sont encore à apporter via le développement de :

- La connaissance des processus
- La caractérisation *in situ*
- Des additifs reconnus sains

Des études sur les voies d'administration ont permis d'améliorer l'efficacité de thérapies. De plus, des méthodes de protection des protéines et des peptides ont mené à l'augmentation de leur durée de vie ainsi que l'augmentation de l'efficacité du principe actif. D'autres études seront nécessaires pour des applications.

## Session 5 : Table ronde – Prédiction de stabilité approche plateforme, perspectives

Cette table ronde animée par **Sylvain HUILLE** (Sanofi) et **Sylvain PEYRACHE** (Accinov) a rassemblé des acteurs issus du monde de la santé/pharmaceutique et de l'agroalimentaire : **Didier CLENET** (Sanofi Pasteur), **Denis CHÉREAU** (IMPROVE), **Jean-Eudes VENDEVILLE** (Innov'IA), **Nicolas MIGNARD** (Wyatt Technologies France) et **Manuel GEA** (BMSystems).

Le sujet de cette table ronde était de prédire la stabilité des protéines par l'intermédiaire d'une approche plateforme. Cette approche se définit comme un ensemble d'outils et de méthodologies standardisés permettant d'obtenir des informations et de sélectionner la protéine candidate au développement.

Cette approche plateforme s'avère être aussi importante dans le domaine santé/pharmaceutique pour le développement de biothérapeutiques que dans le domaine agroalimentaire, que ce soit au niveau de protéines animales ou végétales.

Cependant, l'une des différences principales entre ces deux domaines repose sur le fait qu'en agroalimentaire, les protéines se retrouvent souvent couplées à d'autres composants tandis qu'en santé/pharmaceutique, il s'agit de protéines plus purifiées. Ainsi, une question se pose : est-il possible de trouver des points de convergence entre ces deux domaines d'application.

Il est important de noter que dans l'industrie pharmaceutique, la pression la plus importante se situe au niveau du « time to clinic » c'est-à-dire du temps qui s'écoule entre le moment où la protéine purifiée est extraite du bioréacteur et le moment où elle est injectée au patient. Certes, ce délai est de plus en plus court mais il faut sans cesse l'optimiser. Il est primordial d'obtenir rapidement un produit pouvant être injecté tout en respectant des mesures de sécurité et de documentation permettant de maintenir des dossiers d'enregistrement.

En santé/pharmaceutique, les robots peuvent fabriquer des formulations mais la problématique principale repose sur l'analyse en aval de ces formulations.

L'utilisation d'automates permet de se centrer rapidement sur les meilleurs résultats et ainsi d'éliminer les formulations les plus mauvaises. Quant à la modélisation cinétique, elle mène à la sélection des candidats les plus intéressants tout en prenant en compte la prédiction à long terme.

Les deux domaines d'application s'accordent sur un point : la rapidité et le gain de temps réalisé grâce aux automates. Cependant, le temps d'analyse reste long et difficile. Aussi, plus les procédés sont automatisés, plus il est nécessaire d'être expert et de garder un regard critique sur les analyses : il ne faut pas oublier la donnée brute. Cependant, ce qui demande le plus de temps reste encore les recherches à effectuer en amont, c'est-à-dire, avant de lancer une quelconque manipulation sur une plateforme.

Un déplacement de compétences est actuellement observé ce qui demande au personnel d'être multifonctionnel : chacun doit être expérimenté sur plusieurs techniques différentes. Cet aspect pluridisciplinaire se doit d'être de plus en plus développé au fur et à mesure que les technologies évoluent, et dans tous les domaines.

Cependant, il est important de rester concentré sur l'objectif principal : c'est l'humain qui élabore sa méthode à la main et qui transfère ses connaissances au robot tout en gardant un esprit ouvert et sans se limiter.

Du côté de l'agroalimentaire, ce secteur se divise en deux niveaux :

- Un premier niveau regroupant les fournisseurs d'ingrédients et d'additifs ainsi que les auxiliaires technologiques
- Un deuxième niveau de fabrication de produits finis

Le premier niveau a besoin d'automatisation afin d'augmenter la rentabilité tandis que le second nécessite une standardisation permettant d'obtenir des produits finaux constants. Avant de lancer une formulation il faut donc standardiser les méthodes. Cette standardisation permet ainsi une harmonisation des pratiques.

La saisonnalité est un phénomène ayant un fort impact dans le domaine de l'agroalimentaire ce qui n'est pas le cas en thérapeutique. En effet, l'agroalimentaire se retrouve influencé par l'année, les saisons, les récoltes etc. En revanche, la santé/pharmaceutique se retrouve confrontée à ce problème principalement au sujet du vaccin annuel contre la grippe.

De plus, les procédés utilisés en agroalimentaire sont différents d'un groupe à l'autre, d'une entreprise à l'autre ce qui est moins fréquent en santé/pharmaceutique où les procédés de formulations sont plus similaires. L'agroalimentaire a donc besoin d'une homogénéisation des techniques utilisées.

L'une des problématiques évoquée repose sur le fait de savoir si une entreprise va s'équiper de matériel car il n'y a pas qu'un seul outil mais plusieurs et tout cela dépend du coût final du produit. Côté santé/pharmaceutique, les entreprises cherchent à gagner du temps et vont donc s'équiper. Côté agroalimentaire, il n'y a pas forcément d'urgence, les entreprises vont donc plus facilement se rapprocher d'une plateforme pas obligatoirement robotisée : c'est le phénomène de **mutualisation** ; c'est-à-dire le partage d'outils très onéreux. Cette mutualisation permet de faire fonctionner des équipements coûteux plus fréquemment que si une seule entreprise était amenée à les utiliser.

Il y a toujours une nécessité de nouvelles méthodes et d'étudier leurs impacts sur des aspects industriels et économiques. L'idéal serait d'obtenir des informations sur plusieurs paramètres à partir d'un seul et même échantillon.

Nous pouvons ainsi trouver des points de convergence et de divergence entre les domaines santé/pharmaceutique et agroalimentaire :

**Tableau 5 : Points de convergence et de divergence existant entre le monde de l'agroalimentaire et le monde de la santé/pharmaceutique**

<b>Convergences</b>
Analyse de modélisation
Automatisation
Data management
Méthodes d'analyse
Nombre de particules
pH optimum
Stabilité thermique

		<b>Santé/pharmaceutique</b>	<b>Agroalimentaire</b>
<b>Divergences</b>	Quantité	Milligramme*	Kilogrammes voire Tonnes
	Prix	De 600€/kg à 15 000€/kg	de 60cts/kg à 15€/kg
	Formulation	Homogène	Dépendante du produit final
	Etat protéique	Purifié	Couplé à des adjuvants
	Base des informations	En amont	En aval : sur les applications

\*Mise à part les vaccins.

## Conclusion

Les problématiques liées à la stabilité des protéines et des peptides sont multiples. De plus, elles divergent selon le domaine d'application dans lequel ces entités sont utilisées. En effet, des paramètres comme le prix, la quantité nécessaire, le type de formulation ou encore l'état protéique attendu pour les études varient entre les secteurs de la santé/pharmaceutique et de l'agroalimentaire. A l'heure actuelle, des perspectives sont mises en place afin que ces secteurs puissent **converger** dans une seule et même direction. Pour cela, un partage de connaissances mais aussi d'outils et de techniques est nécessaire. Ces convergences sont par exemple, la taille et le nombre de particules, le pH et la température optimum etc. Il faut également garder à l'esprit que plus les manipulations sont complexes, plus il est difficile de les maintenir constante. De nombreux freins persistent, par exemple, si des changements dans le procédé utilisé sont opérés, des risques de toxicité peuvent être induits. Ainsi, il est primordial d'effectuer des études comparatives des résultats obtenus selon différentes techniques. Il est également essentiel d'avoir des données sur la stabilité qui correspondent à la réalité permettant de mieux cerner les études à réaliser, les quantités nécessaires à produire et donc de limiter les pertes pour des avantages économiques certains.

Les industriels doivent rester vigilants sur les études d'interactions des protéines : en effet ces acquis mènent à une limitation des effets négatifs.

En agroalimentaire, l'utilisation de protéines végétales peut s'avérer être une réelle alternative aux protéines animales. Cependant, malgré le fait qu'elles permettent de diminuer l'impact environnemental et sanitaire, il est important de multiplier les études d'interactions négatives ou d'allergies potentielles.

Ce colloque a permis des échanges fructueux entre académiques et industriels de l'agroalimentaire et de la santé/pharmaceutique et aussi entre les équipementiers, les développeurs de méthodes analytiques innovantes et les utilisateurs.

Des points de convergence sont apparus et demandent à être soutenus à l'avenir. Une réflexion est en cours afin d'évaluer l'intérêt de poursuivre sur cette thématique.

Ophélie LETHUILLIER  
Clarisse TOITOT

## Liste des abréviations

*ACC: Activité Anti-Complémentaire*

*ANSM: Agence Nationale de Sécurité du Médicament*

*CNRS: Centre National de Recherche Scientifique*

*DC: Dichroïsme Circulaire*

*DLS: Dynamic Light Scattering*

*DSC: Differential Scanning Calorimetry*

*HOS: Higher Order Structure*

*Ig : Immunoglobuline*

*IL: Interleukine*

*IMT: Institut des Métiers et des Technologies*

*INRA: Institut National de la Recherche Agronomique*

*ITC: Isothermal Titration Calorimetry*

*PLGA: Poly(Lactic-co-Glycolic Acid)*

*RMN : Résonance Magnétique Nucléaire*

*SEC: Size Exclusion Chromatography*

*SPR: Surface Plasmon Resonance*

*TNF: Tumor Necrosis Factor*

*TSA: Thermal Shift Assay*

*UV: Ultra-Violet*